

SHUSAKU YAMAMOTO

U.S. Patent Application S.N. 09/914,546

Your Ref: YAMZ 2 00010

A partial translation of Daigen M. et al.,  
Hokuriku Sakumotsu-Gakkaiho 30:80-82 (1995)

(page 81, Table 4)

Table 4: The composition of DKN medium

The inorganic salts of R2-medium  
[with the proviso that the concentrations of potassium  
nitrate and ammonium sulfate is diluted to 1/5 level]

The vitamins of B5-medium

5mM aspartic acid

5mM glutamine

30g/l sucrose

pH of the medium 5.8 (adjusted by 1N KOH)

---

(page 82, left column, line 10 to right column, line 6)

From the results as described above, it was demonstrated that a liquid medium which contains R2-medium's inorganic salts [with the proviso that the concentrations of potassium nitrate and ammonium sulfate is diluted to 1/5 level], B5-medium's vitamins, 5mM aspartic acid and 5mM glutamine is suitable for the suspension culture of Koshihikari (DKN medium; Table 4). In the shake culture of the callus with this medium, passage culturing every week and sieving the culture every 2 weeks increased the volume about 4 to 5 times per 1 week culture. By using the DKN medium (2mg/l of 2,4-D and 8g/l of agarose) for induction of callus from the seed of Koshihikari, 76% callus-induction rate was demonstrated. Therefore, this medium was suitable for the induction of callus from the seed, as well as for liquid medium for the suspension culture of Koshihikari.

北陸作物学会報30: 80-82 (1995)

## コシヒカリの効率的な懸濁培養条件

大源正明・川上 修・長沢裕滋  
(新潟県農業試験場)Efficient Suspension Culture of Rice (*Oryza sativa* L. cv. Koshihikari)Masaaki DAIGEN, Osamu KAWAKAMI and Yuji NAGASAWA  
(Niigata Agricultural Experiment Station, Nagaoka 940, Japan)

Abstract The suspension culture medium of rice (cv. Koshihikari) was investigated.

Koshihikari's calli proliferated well in DKN liquid medium that contained R2 inorganic salts ( $\text{KNO}_3$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration were diluted to 1/5), B5 vitamins, 5mM aspartic acid, 5mM glutamine and 30g/l sucrose with 1mg/l 2,4-D.

キーワード: イネ, カルス, 懸濁培養, コシヒカリ.

Key words: Callus, Koshihikari, Suspension culture, Rice.

イネの形質転換植物の作出において、プロトプラスト培養系の開発は重要な課題で、特に良質良食味品種であるコシヒカリの培養系の開発は重要である。これまで、コシヒカリのカルスをN6培地で液体振とう培養した場合に著しい褐変が生じたり、これを抑制するため、培地組成の希釈効果を検討した結果、R2培地<sup>1)</sup>の無機塩類とB5培地<sup>2)</sup>のビタミン類の濃度を1/5に希釈した培地組成を基本とする1/5RBC培地<sup>3)</sup>(第1表)を報告し、コシヒカリのカルスの維持・増殖に用いてきた。しかし、本培地においてはカルスの褐変は抑制されるものの増殖率が低く、より効率的な懸濁培養用の液体培地の開発が必要であった。今回、カルスの褐変に関与する培地成分と、カルスの増殖に及ぼすアミノ酸の影響を検討した結果、コシヒカリのカルスの効率的な懸濁培養条件を明らかにしたので報告する。

## 材料と方法

実験1: RBC培地の培地構成成分の希釈がカルスの増殖に及ぼす影響

1/5RBC培地で約3カ月間培養した5種類のcell lineを供試した。RBC培地を基本培地として、培地構成成分を各々1/5濃度に希釈した液体培地に、共通成分として2,4-D 1mg/lとシロ糖30g/lを加え、培地pHを5.8に調整した。これらの培地にうらごし操作<sup>4)</sup>したカルスを移植後、7日間毎に継代培養して、21日間の振とう培養を行った。カルスの増殖率は、培養終了後のカルスを回収し、試験管内

で約30分間の自然沈降後に体積を求め、培養開始時のカルスの体積の比より算出した。

実験2: カルスの増殖に及ぼすアミノ酸の影響

カルスは実験1と同一のcell lineを約5カ月間培養したものを供試した。RBC培地から硝酸カリウムとカザミノ酸を除き、硫酸アンモニウムを1/5濃度に改変し、硫酸カリウム20mM、2,4-D 1mg/l及びシロ糖30g/lを加え、第2表に示した6種類のアミノ酸をそれぞれ10mM添加した液体培地(pH5.8)を調製した。これらの培地にカルスを移植して、実験1と同様に21日間の振とう培養を行ない、カルスの増殖率を調べた。

実験3: カルスの増殖に及ぼすアミノ酸の組み合わせとその濃度の影響

カルスは実験1と同一のcell lineを約7カ月間培養したものを供試した。硝酸カリウムと硫酸アンモニウムを1/5濃度に希釈したR2培地の無機塩類に、B5培地のビタミン類を加えた培地を基本培地に用いて、アルギニン、アスパラギン酸及びグルタミンを表3に示した8種類の濃度で組み合わせた培地を調製した。各培地にカルスを移植して、実験1と同様の方法で14日間の振とう培養を行ない、カルスの増殖率を調べた。

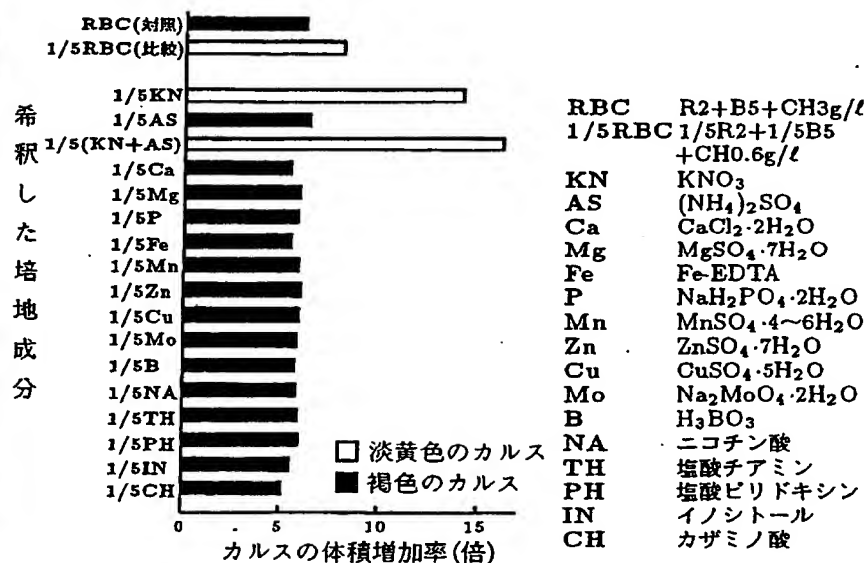
## 結果と考察

筆者ら<sup>3)</sup>は第1表に示したRBC培地を用いてコシヒカリのカルスを培養した場合には褐変が観察されるが、無機塩類、ビタミン類及びカザミノ酸濃度を

1/5に希釈した培地（1/5RBC培地）ではカルスの褐変が抑制されることを既に明らかにした。ここではRBC培地に含まれる培地成分のうち、カルスの褐変に起因する培地構成成分を特定する目的で実験を行なった。RBC培地を構成する各培地成分を1/5濃度に調製した液体培地において、コシヒカリのカルスを振とう培養した結果を第1図に示した。硝酸カリウムを1/5濃度に希釈した場合に、カルスの褐変が抑制されると共に増殖率が向上した。この結果より、コシヒカリのカルスの褐変を引き起こす要因は、RBC培地に含まれる高濃度の硝酸カリウムであると考えられた。津川ら<sup>9)</sup>はコシヒカリの懸濁培養にN6培地のアンモニア態窒素を除き、硝酸態窒素を1/4量に減らしたKSP培地を用いている。したがって、コシヒカリの懸濁培養には無機態窒素を低濃度にした培地の選択が重要であると考えられる。

第1表 RBC培地及び1/5 RBC培地の組成

RBC培地	R2培地の無機塩類 + B5培地のビタミン類 + カザミノ酸 3 g/ℓ + ショ糖 30 g/ℓ 培地 pH5.8
1/5 RBC培地	1/5濃度のR2培地無機塩類 + 1/5濃度のB5培地ビタミン類 + カザミノ酸 0.6 g/ℓ + ショ糖 30 g/ℓ 培地 pH5.8



第1図 RBC培地を構成する各種培地成分の希釈がカルスの増殖に及ぼす影響

第1図における硝酸カリウムを1/5濃度に希釈した培地、あるいは硝酸カリウムと硫酸アンモニウムを1/5濃度にした培地の主な窒素源は、カザミノ酸に含まれるアミノ酸であることが推察された。そのため、コシヒカリのカルスの増殖に及ぼすアミノ酸の影響を実験2で検討し、結果を第2表に示した。アミノ酸無添加の培地に比べ、アルギニン、アスパラギン酸及びグルタミンを添加した培地において、カルスの増殖率が高かった。したがって、コシヒカリの懸濁培養の効率化には、これら3種類のアミノ酸が必要であると考えられた。

実験3の結果を第3表に示した。アルギニン

第2表 カルスの増殖に及ぼすアミノ酸の影響

アミノ酸	カルスの体積増加率(倍)
無添加	2.3
アルギニン	6.8
アスパラギン酸	10.5
グルタミン	5.1
グリシン	1.6
ロイシン	1.6
プロリン	2.5

アミノ酸添加量 10 mM  
培養期間 21日間

第3表 アミノ酸の組み合わせがカルスの増殖に及ぼす影響

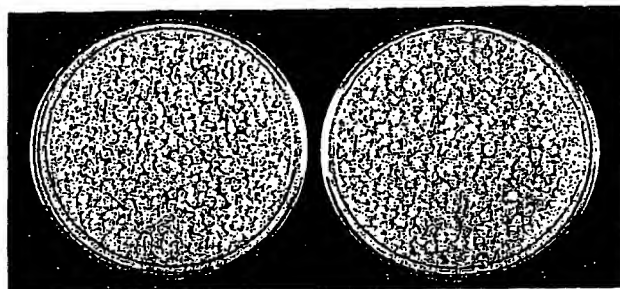
Arg (mM)	Asp (mM)	Gln (mM)	カルスの体積増加率(倍)
0	5	5	25.4
0	10	10	33.3
5	0	5	7.4
10	0	10	8.3
5	5	0	15.9
10	10	0	15.4
5	5	5	18.7
10	10	10	17.3

培養期間 14日間

注) Arg:アルギニン, Asp:アスパラギン酸, Gln:グルタミン

第4表 DKN培地の組成

R2培地の無機塩類  
〔ただし、硝酸カリウムと硫酸アンモニウムは1/5濃度に希釈〕  
B5培地のビタミン類  
アスパラギン酸 5 mM  
グルタミン 5 mM  
ショ糖 30 g/ℓ  
培地 pH 5.8 (1N KOHで調整)



第2図 カルスの形態に及ぼすアミノ酸濃度の影響

左：アスパラギン酸 5 mM + グルタミン 5 mM

右：アスパラギン酸 10 mM + グルタミン 10 mM

無添加でアスパラギン酸とグルタミンをそれぞれ 5 mM ずつ、あるいは 10 mM ずつ組み合わせた培地でカルスの増殖率が高かった。アスパラギン酸とグルタミンのそれぞれの添加量が 5 mM の培地と 10 mM の培地におけるカルスの形態を比較したところ、10 mM ではカルスの色調に淡い褐色を呈し、カルス塊が大きく柔らかであった。一方、5 mM ではカルス塊は硬く、色調は淡黄色であり、10 mM より優れていた(第2図)。

以上の結果より、コシヒカリの懸濁培養には、硝酸カリウムと硫酸アンモニウムを 1/5 濃度に希釈した R2 培地の無機塩類に、B5 培地のビタミン類、アスパラギン酸 5 mM 及びグルタミン 5 mM を添加した液体培地が適していた (DKN 培地; 第4表)。本培地を用いたカルスの振とう培養において、1 週間毎に継代培養し、かつ 2 週間毎にうらごし操作を行

なうことにより、1 週間の培養で約 4～5 倍の体積増加率を示す。なお、コシヒカリの種子カルス誘導に DKN 培地 (2,4-D 2 mg/l, アガロース 8 g/l) を用いた場合、76% のカルス誘導率を示したため、本培地はコシヒカリの懸濁培養用の液体培地とともに、種子カルス誘導培地としても適していた。

#### 引用文献

- 1) 大源正明ら 1992. 北陸作報 27: 54-55.
- 2) 大源正明ら 1993. 植物組織培養 10: 176-179.
- 3) Gamborg, O. L. et. al. 1968. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- 4) Ohira, K. et. al. 1973. Plant Cell Physiol. 14: 1113-1121.
- 5) 大槻義昭ら 1988. 育種 38 (別1): 78-79.
- 6) 津川秀仁ら 1994. 育種 44 (別2): 49.